



Fig. 6 LC/MSⁿを用いた糖タンパク質性医薬品の構造特性解析のためのストラテジー

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

血管新生療法の現状と展望

分担研究者 新見 伸吾 (国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第三室長)

研究要旨

血管新生療法は、新しい血管の成長を促進させることで虚血組織の血流を回復させる虚血性疾患の治療法である。虚血性疾患の患者は極めて多く、既存の治療法に不適症例も少なくないことから、血管新生療法の開発が急務の課題となっている。これまで行なわれた多くの研究から、血管新生に関わるたん白質、遺伝子、細胞を利用したいくつかの血管新生療法が提案され、虚血動物モデルを用いた基礎的な検討をはじめ、進行性の冠動脈および末梢動脈疾患の患者を対象にした臨床試験などによって有効性が評価されてきた。これらの血管新生療法は動物モデルや前臨床試験では有効性を示唆する結果が得られたが、初期の二重盲検無作為臨床試験では有効性が確認されなかった。しかしながら、血管新生療法は、現在の様々な問題点を克服しさらに改良を重ねることにより、近い将来において、虚血性疾患の有効な治療法として臨床応用されるものと大いに期待されている。

A. 研究目的

血管系は我々の体の中で最も大きな組織で、角膜と軟骨など一部の組織を除き、全ての組織に存在する。そのため、多くの組織における血管の損傷は、様々な疾患の原因となっている。実際、心臓や脳の大動脈あるいは中動脈におけるアテローム性動脈硬化症による閉塞が生じることで脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。これらの疾患はいずれも血管の機能が失われ虚血となることで発症するもので、先進国に共通する致命的な疾患のひとつとして、その治療法の開発が重要な課題となっている。

虚血性疾患のひとつである虚血心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率および死亡率が高く、米国の場合その患者数は1000万人以上、世界全体では数億人にも達する。

虚血心臓病の症状は、心筋の損傷がない労作性狭心症から、左心室において可逆的および非可逆的な障害のある心筋虚血の段階、非可逆的な心筋障害の段階、うっ血性心不全に至る壊死まで幅広い。その進行速度は主として動脈硬化性プラークの成長あるいは一過性の破裂に依存している。このような症状が進行すると慢性的な安定狭心症あるいは心筋梗塞を含む急性冠状動脈症候群になり、心外膜冠動脈において血流が障害される。その結果、冠動脈血液により酸素が必要量供給されない場合、心臓組織が虚血になり、冠動脈のかん流が心筋の酸素要求性に対応できなくなる。虚血組織に対して血液の供給を回復は、冠動脈かん流を改善させる必要がある。その戦略として従来から用いられてきた治療法は、冠動脈バイパスあるいは冠動脈血管形成術のような外科的に、障害が起きた心筋に対する血流が物理的に回復させる方法、硝酸やβ-ブロッカーのような薬物を投与することで心筋の酸素要求性を低下させ、かん流の供給/需要のバランスを回復させる方法などである。

しかし、従来の治療法では、改善されない症例は少なくなく、増加の一途である。また、侵襲的な治療法では効果的な再血管形成が期待できない、いわゆる選択肢のない末期の冠動脈疾患の患者の存在も無視できない。これらの患者は一般的に高齢で、びまん性冠動脈疾患、末梢小血管、高コレステロールレベル、糖尿病などの合併症を有していることが特徴で、このような状態では生体に本来備わっている虚血に対する血管新生および動脈形成能そのものが低下している。したがって、このような状態の患者は、従来の血管再生術による治療が困難となる。今後、高齢化に伴ないこのような症例が増加することが危惧される。

虚血性疾患の原因となる冠動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの、鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては、成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。65歳以上では1000人あたり10人の症例の発症率であることから、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合、大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていないものの、放置しても血管は再形成されないため、治療は必須である。鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人(165%の増加)と年々増加しており問題となっている。

このような疾患に対して、血管新生療法は、既存の血管から新しい血管を再生させ、罹患した動脈の機能を再建することが部分的ではあるが可能で、動物モデルおよび前臨床試験では血管新生療法による血管の成長促進(血管新生)は標的器官のかん流と機能の改善において効果的であることが示唆されている。しかしながら、血管新生の詳細なプロセスの解明、临床上において有効な血管新生療法の確立は、今後の課題として残されている。

本研究では、これまで試みられてきた血管新生療法として、たん白質、遺伝子治療、細

胞治療を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスについての最近の知見について調査および研究を行なった。

B. 研究方法

これまで試みられてきた血管新生療法として、たん白質、遺伝子治療、細胞治療を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスについての最近の知見について、参考文献1~4を中心に調査および研究を行なった。

C. 研究結果

1. 血管新生(neovascularization)の生理的な概念

血管発生(vasculogenesis)、狭義の血管新生(angiogenesis)、動脈新生(arteriogenesis)は理論的に異なったプロセスであり、これらのプロセスを経て、広義の血管新生(neovascularization)が起きる。なお発生学の観点からは、広義の血管新生(neovascularization)は血管発生と狭義の血管新生(angiogenesis)に大別される。なお、本稿においては、特にことわらない限り、血管新生という言葉はangiogenesisを指す。

血管発生とはEPC(endothelial progenitor cell、内皮前駆細胞)からのin situにおける血管形成のプロセスである。また、血管は既存の血管から発芽するか、あるいはトータルとして血管新生に分類されるプロセスである。内皮および造血細胞は、共通の幹細胞である血管芽細胞に由来する。卵黄嚢において、血管芽細胞は細胞集合体あるいは血島を形成し、その中で中心部に位置する造血幹細胞は血球系に、辺縁部に位置するEPCは内皮細胞にそれぞれ分化する。EPCおよび血管芽細胞が末梢血から分離され、EPCが活発な血管新生部位の中に見出されるまでは、これら細胞は胎児の発達のみに関与すると考えられていた。その程度につい

ては不明であるが、血管発生は狭義の血管新生と共に、成人組織における血管新生に寄与すると考えられている。また、組織虚血により EPC が新生血管へ強制動員され、取り込まれるという知見がある。EPC と造血幹細胞の表面マーカーは例えば Flk-1、Tie-2、c-Kit、Sca-1、CD133、CD34 のように同じものが多く、マーカーにより単純に EPC を規定することはできない。EPC は VE-カドヘリンそして AC133 も発現する。AC133 は EPC に特異的に発現するオーファンレセプターであり、EPCs が成熟内皮細胞に分化するとその発現は消失する。造血幹細胞に加えて、EPC の由来はサイドポピュレーションの細胞 (CD34⁻、c-kit⁺、Sca-1⁺) および多能性成人幹細胞あるいは MAPC (CD34⁻、CD45⁻、c-Kit⁻、GlyA⁻) のような骨髄由来幹/前駆細胞である。なお、EPC の分化における組織特異的シグナルは不明である。

血管新生とは、内皮細胞の活性化、細胞外マトリックスの分解、増殖、遊走さらには周皮細胞そして平滑筋細胞の強制動員に依存した新しい血管壁の安定化のプロセスによる後毛細血管静脈からの新しい毛細血管の発芽を指している。血管新生の促進は生理学的および病態生理学的条件下において低酸素状態あるいは虚血により起こる。転写活性化因子である HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) は、恒常的に発現する HIF-1 β サブユニットと酸素により調節される HIF-1 α サブユニットのヘテロダイマーである。HIF-1 α は低酸素により起きる血管新生の促進において中心的な役割を果たしている。HIF-1 α は VEGF、Flt-1、neuropilin-1、Ang-1 (angiopoietin-1)、Ang-2、PDGF、PIGF (placental growth factor) のような各種血管新生メディエーターの発現を調節する。さらに、HIF-1 α の Ang-1 および Ang-2 に対する作用は細胞により異なり、活性化因子あるいは抑制因子として作用し、内皮細胞の増殖あるいは内皮細胞-平滑筋細胞の相互作用を調節する。HIF-1 α の活性化は TNF- α 、IL-1、PR39 のような炎症性サイトカインにより誘導される。

内皮細胞の遊走および増殖は毛細血管の管腔形成に必要であるが、これらの作用は PAI/プラスミン系のプロテアーゼ、MMP、ヘパリナーゼにより調節される。プラスミノゲンは様々な場所に存在する血漿たん白質であるが、プラスミノゲン活性化因子である u-PA および t-PA によりプラスミンに転換される。プラスミンは特定の MMP (matrix metalloprotease) の活性化を介して、ファイブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンのような細胞外マトリックスたん白質を分解する。また、その分解は TIMP (tissue inhibitor of metalloprotease) および PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) により阻害される。

新しい血管の成熟には、PDGF、TGF- β 、Ang-1 による未熟な内皮細胞ネットワークの安定化が関与していると考えられている。また、その安定化のプロセスには、周皮細胞/平滑筋細胞の増殖および分化の促進、内皮管への強制動員および内皮細胞の再プログラミングが含まれる。この期間において、その後の運命、すなわち動脈あるいは静脈のどちらに分化するかは決定、さらにはその発達も決まる場合がある。著しく障害された動脈が再形成されるためには血管が外側へ向かってリモデリングされる過程が必須がある。そのプロセスは、側副の形成あるいは動脈形成とは必ずしも同一ではないものの、基本的な機構は類似していると考えられている。一方では、内皮前駆細胞が血管新生と動脈形成の両方に関与するとも言われている。

動脈形成は成熟のプロセス、あるいは恐らく側副導管の de novo の成長を指している。動脈形成の促進には、閉塞した動脈に近接した部位における剪断応力の増加、およびその後起きる血液由来の単核球細胞の蓄積が重要であると考えられている。また、動脈形成の促進因子には CXC ケモカイン、FGF、PDGF、VEGF など数多くの増殖因子が関与している。動脈形成の重要な点は、血管新生と同様に、側副の発達がコンダクタンス血管において de novo で起きるか、あるいは既存

の血管が再構成され肥大するかである。既存の側副の広さが種間において大きく異なること、関与するその他の因子について解明が不十分であるため、このようなプロセスが実際起きているかどうかについてはよくわかっていない。げっ歯類の後肢虚血モデルでは明らかに既存血管が再構成される。既存の側副の数及び成長は遺伝的な因子に影響され、種内及び種間で変動すると考えられる。

血管新生の開始についてはよくわかっているが、その後、効率的良く動静脈のネットワークが形成されるプロセスについてはよくわかってはいない。例えば、血管新生がシステマティックに起こり、その結果、動脈および静脈が形成される、分子および血流力学的機構に関する研究はまだ始まったばかりである。動脈・静脈を規定する因子に関する知見は、ゼブラフィッシュの研究がほとんどである。血液循環が始まる前の段階で、VEGF、Notch-Jagged、Ephrin が動脈・静脈を規定すると考えられる。

2. 血管成長の機構

血管の成長は最終到達点、最初の刺激および組織に依存し異なった機構で起きる。発生期の胚において、冠状動脈は脈管形成により形成される。その過程において、方向および近位および遠位動脈の口径までもが血流の無い状態で決定される。成人においても血管は同様な機構で成長するが、組織の環境が異なる場合、そこで得られたデータを心筋にあてはめる場合は注意する必要がある。成人心筋において動脈の再構成は主に血流および血管壁に対する剪断応力の変化により生じる。動脈の直径は血流の速度により決まる。その関係が正常な状態から逸脱すると血管は成長あるいは退縮する。側副血管は血管壁が薄い微小血管吻合を形成し、その血管吻合は全て冠状動脈とつながる。一旦冠状動脈内で狭窄が形成されるか、主要な動脈で急性梗塞が起きると、血流は最も楽な道を取り、側副動脈を介して周辺へとその方向を変える。そして、血流、静水圧、側副の血管壁に対する剪断応

力が急速に増加し、内皮の活性化および血管増殖因子のアップレギュレーションが起きる。これら増殖因子により血管が増殖および再構成されると、その血管は肥大し中膜それ自体に成長する。その時、生物学的な機能を有する側路が形成され、コンダクタンス血管において血流の低下が代償される。側副形成は数週間から数ヶ月で完了する。そして、急速に成長し直径が増加するが、側副のコンダクタンスは側副により置換される冠状動脈の値には達さない。

心筋は通常循環血液から酸素を最大で70%を取り出すことができ、心筋の機能は好氣的代謝にも強く影響を受ける。静止期における既存の側副が即時に膨張すると、組織に流れる血流を必要量の半分まで置換できる。血流が完全に枯渇している領域は回復過程で壊死を起こすと同時に繊維性瘢痕組織を形成する。一方、血流が十分ではないがある組織では生きている冬眠心筋はパワーセーブモードに変わる。組織の損傷の程度、心臓機能の回復そしてさらに患者の生存は血流が早期に回復するかどうかによって依存している。側副血管の成長は正常な有酸素心筋において閉塞部位の近位で起こる。一般的な学説によると有酸素組織は血管新生刺激に対しては恐らく反応しないと考えられている。最終目標が心筋における血管新生を誘導することである場合、有酸素組織でも効力のある増殖因子そして健康な組織に対して十分な遺伝子導入効率がある遺伝子と治療ベクターを用いることは一番重要である。側副血管の成長は内皮の変化、平滑筋の増殖および結合組織の再構成が組み合わさって起きるので、用いる増殖因子は内皮細胞から平滑筋細胞さらには繊維芽細胞まで直接的あるいは間接的に影響を及ぼすものを用いる必要がある。

血管新生、毛細血管の増殖と肥大は虚血に対して生体が反応することにより起きる。心筋梗塞後に形成される瘢痕は生きているが、冬眠の心筋に囲まれている。新血管のネットワークは数日以内に形成され、危険にさらされている組織に栄養を与える。血管新生は内

皮細胞の増殖と遊走である。内皮細胞は既存の毛細血管から広がり、血管を発芽させる。新しく形成された血管は週皮細胞にコートされるまでの間は退縮しやすい。このような可塑性のある時期である中間段階では血管ネットワークが整備され、組織の代謝要求に応じることができるようになる必要がある。過剰に毛細血管ネットワークが成長すると、局所の組織かん流が増加するが、閉塞血管領域の血流を代償し、心臓の機能を維持するためには、虚血領域の上流からもっと大きな血管が成長する必要がある。虚血域において血管新生が起きると、毛細血管床の局所における抵抗性が低下し、同じ圧力で動脈上流における血流が増加することになる。

梗塞部位において毛細血管ネットワークが機能するには、虚血領域上流の大動脈からの血流が必要である。大側副動脈において酸素と栄養物の交換が効果的に起きるには、機能を有する毛細血管ネットワークが必要である。血管形成と動脈形成は異なったプロセスであり、その特徴も異なるが、心筋の血流低下に対する生体の反応という点では関連している。

3. 成人の心筋における血管新生 (neovascularization) の過程

慢性虚血成人心臓における血管新生 (neovascularization) は血管新生、動脈形成、場合によっては血管発生を含む数々のプロセスから成り立っている。成人における血管新生は HIF-1 α の活性化を介して、組織低酸素状態により主に促進される。HIF-1 α は VEGF および VEGF 受容体 flt-1 そして neuropilin-1 の転写を増大させる。その結果、毛細血管のベッドサイズが顕著に増大するが、近位動脈導管における流量が十分ではない病巣があると、組織に対し全体的な血流の増加には有効ではない。対照的に、動脈形成は側副導管の成熟化あるいは de novo の成長のプロセスであり、有効に血流を運ぶことのできる血管を産生する。これらの血管の直径は血管造影で視覚化できるほどの十分な大きさである。最初の動脈形成刺激はせん断応

力と動脈狭窄の部位における血液由来単核細胞の蓄積と考えられており、結果として FGF, PDGF, VEGF を含む多くの血管新生増殖因子の遊離および産生が起こる。さらに複雑なことに、成人における血管新生 (neovascularization) には血管新生および動脈形成だけでなく、血管発生も含まれると考えられている。虚血疾患において、血管発生の冠状動脈と末梢循環における意義についてはよくわかっていない。そしてまさにこの事が問題になっている。従って、血管新生、動脈形成、恐らくは血管発生が成人の心臓において血管新生 (neovascularization) に関与する。その中で動脈形成が心筋血流の改善に最も重要である。

4. 虚血における増殖因子の発現調節

ほとんどの増殖因子は虚血組織でアップレギュレートされる。最もよく知られている組織低酸素反応系では低酸素刺激により転写因子 HIF-1 α のレベルが上昇する (図 1)。HIF-1 α は血管新生標的遺伝子のプロモーターに結合し転写を誘導する。このような血管新生標的遺伝子にはエリスロポエチン、VEGF-A、VEGFR-1 受容体をはじめ、その他約 40 の遺伝子が含まれる。HIF-1 α の反応が律速段階かどうかは不明であるが、冠動脈疾患に対する動脈形成反応が弱い患者から取り出した単球は、低酸素刺激による VEGF のアップレギュレーションが低下する。同様に、高齢あるいは糖尿病ウサギの下肢において、低酸素刺激による HIF-1 α たん白質の誘導、および DNA 結合能の増加が低下し、その結果、VEGF のアップレギュレーションが低下する。血管新生の要求が高まる時期において、HGF/SF も不足する。閉塞性動脈の患者では低酸素の期間、血管における HGF 産生はダウンレギュレーションされる。同様に c-met 受容体もダウンレギュレーションされる。興味深いことに、低酸素の期間における HGF のダウンレギュレーションは抗 TGF- β 抗体および FGF-2 の遺伝子導入により抑制されることから、TGF- β および FGF-2 は HGF

産生においてそれぞれ抑制および促進因子として作用することが示されている。対照的に、心筋梗塞の患者では、HGF は顕著に増加する。高齢のレシピエントマウスに移植された心臓における血管新生反応は低下するが、その原因としてPDGF-ABの強制動員の低下が考えられる。したがって、PDGF-BあるいはA鎖の補充により、病態が改善される可能性がある。

5. 血管新生療法において有望な増殖因子

5.1 VEGF

VEGFファミリーは現在研究が最も進んでいる血管新生促進因子であり、その中で典型的なものはVEGF-Aである。少なくとも四種類のアイソフォームのVEGF-Aが選択的スプライシングの結果として生成され、121 (VEGF₁₂₁), 165 (VEGF₁₆₅), 189 (VEGF₁₈₉)および206 (VEGF₂₀₆)がある。VEGF₁₄₅のような他のアイソフォームも知られているが、その意義については不明である。VEGFのアイソフォームはヘパリン結合能が異なると血管新生能が異なり、VEGF₁₆₅はVEGF₁₂₁に比べて血管新生能ははるかに高い。一方、VEGF₁₈₉とVEGF₂₀₆はヘパリン硫酸に対する親和性が高いため、細胞あるいはマトリックスに結合したままの状態で存在する。VEGF₁₆₅とVEGF₁₂₁はヘパリンには結合せず、血液循環中で検出される。しかしながら、VEGF₁₆₅はVEGF₁₂₁と異なり他の細胞表面受容体であるneuropilin-1に結合し、neuropilin結合領域の欠損したVEGF₁₂₁に比べて活性が高い。VEGFファミリーは他にVEGF-B (VEGF-3)、VEGF-C (VEGF-2)、VEGF-D、VEGF-EおよびPIGFが知られている。VEGF-Eはウイルスたん白質であり、そのホモログは哺乳類に存在しない。VEGFは三種類のいずれかあるいは全ての種類のVEGF受容体チロシンキナーゼ、flt-1 (VEGFR-1)、KDR/flk-1 (VEGFR-2)、flt-4 (VEGFR-3)に異なった親和性で結合する。VEGFR-2はその中でも血管新生のシグナルトランスダクションを最も強く活性化する。

また、VEGFR-2ほどではないがVEGFR-1もPIGFおよびVEGF-Dが結合することにより同様に活性化し、VEGF-DはVEGFファミリーの中で骨格筋における血管新生およびリンパ管新生の最も強力な誘導因子である。

VEGFは内皮細胞に対して血管新生促進を促進し、それには遊走促進、透過性促進、生存促進、プラスミノゲンアクチベーターおよび間質性コラゲナーゼの生成促進などが関与している。VEGFは平滑筋の遊走は促進するが、平滑筋細胞および繊維芽細胞の増殖は促進しない。VEGFR-3の役割については十分解明されていないが、リンパ管新生に関与していると考えられている。PIGFは後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。

VEGF-Aはその他に以下のような様々な血管新生促進作用を示す。①内皮細胞の培養において管様構造を誘導する。②*in vivo*マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミングを促進することから、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。

VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈のノックアウトマウスは虚血系心筋を発症し、心筋血管新生障害による心臓疾患のため、生後14日以内に死亡する。VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈の欠損により誘導される致死性のフェノタイプは、VEGF₁₄₅とVEGF₁₂₀が発現してもレスキューされない。三種類のVEGF受容体のどれかを破壊すると胎生致死になる。最も顕著なフェノタイプはVEGFR-2の欠損であり、血管形成が完全に障害される。ホモ接合性VEGFR-2遺伝子欠損では血管の形成が不十分で、胎生8.5日で死ぬ。VEGFR-3の欠損では胎生9.5日後初期血管叢の再構成が障害され循環不全となる。したがって、血管の初期における発達には全てのVEGFRが協調的に発現する必要がある。

5.2 FGF

FGFには酸性FGF (FGF-1) および塩基性FGF (FGF-2) だけでなく21種類の構造が関連したポリペプチド増殖因子が含まれる。FGFはチロシンキナーゼファミリー細胞表面受容体および非チロシンキナーゼ受容体syndecan-2に結合し、生物学的な作用を示す。FGFはVEGFと同様に、内皮細胞の増殖、遊走およびプラスミノゲンアクチベーターおよび間質性コラゲナーゼの生成を促進する。また、FGFはVEGFと異なり、中胚葉および神経外胚葉由来のほとんどの細胞、例えば周皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖を促進する。FGF-4は後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。

5.3 PDGF

PDGFはPDGF-AからDより構成されるファミリーのメンバーであり、VEGFと構造的に類似している。その中でもPDGF-BBが最も作用が顕著であり、血管成長促進活性を示すと共に、周皮細胞による新しく形成された血管構造のコーティングを促進することにより、動脈形成を促進および安定化する。さらに、PDGF-BBは側副を誘導し、心筋虚血の前臨床モデルでは、機能だけでなくかん流を改善する。

5.4 その他の増殖因子

G-CSF、GM-CSFおよびMCP-1は単核球の流入を促進することにより、動脈形成を促進する。なかでも、MCP-1は側副の成長部位に達すると、マクロファージにより様々な増殖因子の遊離が遊離され、細胞の増殖が促進される。HGF、IL-6、MCP-1も血管新生因子と考えられており、以下のような作用を示す。①内皮細胞の培養において管様構造を誘導する。②*in vivo*マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミ

ングを促進し、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。Ang-2のみが発現した状態では、内皮細胞同士の結合が緩みアポトーシスが誘導されるが、VEGFの共在下では内皮細胞の生存に必要なシグナルが生じ、細胞の解離により増殖および遊走が起きる。一方、アンジオポエチン-1(Ang-1)は静止状態に発現するが、血管透過性の減少、内皮細胞の結合および内皮細胞周囲の細胞の動員による血管安定化といった作用が示唆されている。Ang-1は静止状態をより安定化させることが示唆されているが、単独あるいはVEGFと組み合わせて過剰発現すると血管新生および動脈形成を促進する。Ang-1は後肢および心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する。さらに、NGF (nerve growth factor)、NPY (Neuropeptide Y)をはじめとする様々な因子が虚血組織において新しい血管の成長を誘導することがみつまっている。

なお、各因子が血管新生 (neovasularization) のどの段階に作用するかについて、Table 1にまとめて示す。

6. 内皮が増殖因子による血管新生促進に及ぼす影響

増殖因子による新血管形成の促進が、内皮の状態によりどのように影響を受けるかについては、ほとんど解明が進んでいない。動物を用い血管新生療法において有効性が示されている研究のほとんど全ては、正常な若い動物が用いられている。一方、研究目的の項で述べたように、臨床試験では進行したアテローム性動脈硬化症の患者で主に高齢者が対象となる。年齢の上昇に伴い、増殖因子による治療効果が低下し、その結果、臨床試験が失敗する可能性も場合によっては否定できない。この可能性は、ApoE^{-/-}マウスにおいて血管新生促進因子の効果があまりよくないという知見からも示唆されている。

7. 血管新生増殖因子たんぱく質を用いた血管新生療法の概要

血管新生療法の最終目的は重篤な作用部位において血管新生増殖因子のレベルを増加させることであり、そのための様々なデリバリーの方法が考えられる。正攻法としては組換えたん白質を局所あるいは組織にデリバリーすることである。このようなたん白質は静脈、動脈内特に冠動脈内、心筋内、心膜内に対するアプローチを用いて投与できる。その場合、デリバリーのタイプにかかわらず、理論的に正確な用量反応性に関するデータは入手可能である。たん白質治療の場合は細胞への遺伝子導入、ウイルスあるいはプラスミドの転写、目的遺伝子のたん白質への翻訳が必要ない。たん白質治療の最大の問題点は血管新生反応の誘導に要する期間において治療効果を示す有効な濃度を維持することが必要ということである。なお、その期間はケースバイケースで異なり一概に定めることはできない。たん白質が新しい血管の成長を直接促進させる場合、新しい血管の成長の開始だけでなく、新しく形成された血管を安定化し成熟させるためには持続的に存在することが必要となるので、必要な期間は数週間の場合もある。他方、

5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項で述べたように、GM-CSF、G-CSF、PIGF、MCP-1 は単核球の強制動因を介して血管の成長および安定化を促進することから、その期間はさほど長くなくてもよいのかもしれない。

8. 血管新生増殖因子たん白質を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究としてたん白質治療が用いられている(Table 2)。FGF-1 (10 μ g/kg) の安全性が冠動脈 CAGB バイパス・グラフト (coronary-artery bypass graft) を受けた三枝冠動脈疾患の 20 人の患者で最初に示された。その患者に対し増殖因子が内胸動脈 LAD (left anterior descending coronary artery) (左冠動脈前下降枝) 吻合の近くに心筋内投与された。血管造影では増

殖因子を処置した患者ではコントロールの患者に比べ、毛細血管充満圧の増加が示唆されたが、その他には冠動脈のかん流あるいは心室機能の改善を示す証拠はなかった。別の CAGB プラス試験では CAGB を受けた 24 人の患者において行なわれた。その患者において、生きているが虚血である心筋に対して、血液を供給する主な動脈の一つは技術的な理由によりバイパスできないと考えられた。全投与量として 10 あるいは 100 μ g の FGF-2 あるいはプラセボを含有する 10 個のヘパリンアルギン酸ビーズを無作為に投与した。3 ヶ月後、100 μ g の FGF-2 を投与した患者における虚血障害の程度は、プラセボに比較して顕著に減少した。このグループの患者は寛解し、一方、コントロールグループの 7 人の内の 3 人は狭心症が持続し、そのうち 2 人はさらに血管再生治療が必要となった。3 年後において、高濃度の FGF-2 を投与したグループでは症状改善が続いた。

冠動脈内 FGF-2 投与の安全性および治療効果は二つの非盲検用量増加試験で試された。両方の場合で、投与によるシステムチックな低血圧の所見はなく、FGF2 は高濃度まで安全であった。多くの患者において、磁気共鳴および放射性映像により心筋かん流の改善を示す客観的な知見だけでなく症状の改善が示された。

治療効果について 337 人の二重盲検フェーズ II 試験で試験された。それにおいては、プラセボのコントロールに対し、冠動脈内へ三つの異なった量 (0.3, 3, 30 μ g/kg) FGF-2 を投与し比較が行なわれた。90 日の追跡データによると、FGF-2 投与患者においてトレッドミル時間が若干改善された。同時に、CCS (Canadian Cardiovascular Society) (カナダの心臓血管学会) 狭心症基準および SAQ (Seattle Angina Questionnaire) (シアトル狭心症質問表) 狭心症頻度基準の有意な改善がみられた。磁気共鳴では虚血領域の全体的な改善はみられなかった。試験のサブグループの解析によると、症状、ETT (excise treadmill time) (運動トレッドミル時間) の改

善、磁気共鳴により測定される障害虚血域の低下示される改善度は、病状がより悪化した患者で最も顕著であった。そのような患者では他の患者と比べ、基準となる運動能が低い、基準となる症状の頻度が高い、放射性映像によるかん流欠損の程度が大きいといった特徴がある。しかしながら、このように FGF が治療効果を有するかどうかについては二重盲検試験を用いた検討が必要である。

二重盲検試験の重要な点は二重盲検プラセボを対照として単に症状の改善を示すだけでなく、増殖因子治療に対し症状の改善を示した患者の集団において、その全体像を評価することである。また、この患者群母集団におけるプラセボ効果の程度と有病率の評価も重要な点である。実際、二重盲検試験におけるプラセボでの反応との比較により、初めて有効性を評価することができる。先に示した試験では、多数のハイリスク患者で冠動脈内 FGF-2 投与の相対的な安全性のみが示されたといえる。

プラセボ反応の有病率と非盲検解析の危険性は冠動脈内および静脈内 VEGF-A₁₆₅ の臨床試験で十分に示されている。冠動脈内 (n=16) および静脈内 (n=14) に VEGF の投与を行った2つの小規模なフェーズ II 試験では、SPECT (single-photon emission computed tomography) (単光子放出コンピュータ断層撮影) イメージングにおいて得られる期待できる結果だけでなく、運動能、症状 (脳梗塞のクラスとして規定) において有意な改善を示すと判定された。これらの試験に続き VIVA (Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis) (虚血における血管内皮細胞増殖因子を用いた血管新生) 試験が 178 人の患者で無作為に行なわれた。この試験では 120 日まで追跡を行い、治療のオプションがない患者に対して、プラセボ、低用量 VEGF₁₆₅ (17ng/kg/min) あるいは高用量 VEGF₁₆₅ たん白質 (50ng/kg/min) を無作為に割り当てた。VEGF₁₆₅ のグループの患者に対して、0 日目に冠動脈内に注射後、

3, 6, 9 日目に静脈かん流を行なった。この試験ではこの母集団に対する VEGF の効果は全体として示されなかった。VEGF₁₆₅ を処置した患者はプラセボと比較して、ベースラインから 60 日までの主要なエンドポイントである ETT において、有意な改善はなかった。120 日まで、プラセボと比較したが、高投与量 VEGF₁₆₅ 処置患者において ETT が改善する傾向はなかった。同様に、処置後 60 日で、VEGF₁₆₅ 処置患者とコントロールの患者を比較すると、狭心症のクラスでベースラインからの改善に違いはなかった。一方で、120 日では、高投与量 VEGF₁₆₅ で処置した患者とプラセボと比較すると、統計的な有意な狭心症のクラスの改善があった。60 日目で行なった心筋かん流の試験では、VEGF 処理の患者とプラセボ処理の患者を比較すると、有意な改善はなかった。

これまで述べた戦略とは多少異なった戦略が小規模の試験で進められた。その中では進行性 CAD (coronary artery disease) (冠動脈疾患) の患者に対して、最初 GM-CSF の冠動脈内投与、続いて 2 週間後に皮下投与を行いその効果が調べられた。生理食塩水で処置した患者ではみられなかったが、GM-CSF 投与の患者において小さいが有意な側副動脈血流の増加が示された。5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項で述べたように、GM-CSF の関連たん白質である G-CSF の薬効は骨髓幹細胞の遊離だけでなく心臓における動脈狭窄の部位に対する単核球の強制動員の増加を介していると考えられているが、本知見はこの考えと矛盾しないしかしながら、最近の試験では、CAD 患者におけるこれらサイトカインの安全性に関する懸念が提起された。

たん白質製剤における増殖因子の安全性はこれまで重大な問題とはなっていなかった。目に見えないほどの小さな腫瘍の増殖促進、アテローム性動脈硬化症の促進、冠動脈プラークの血管新生の促進を介した不安定なプラークの産生など、多くの危険性が理論的には存在するが、今まで試験で見つかっている

ものはない。今までに唯一認められている副作用としては、VEGFによる深刻な低血圧および浮腫そして非常に高濃度（48 μ g/kg 以上）のFGF-2によるCNS（central nervous system）（中枢神経系）の副作用（ありありとした夢、悪夢、情動不安）がある。

9. 遺伝子治療を用いた血管新生療法の現状

現在たん白質治療に代わるものとしては遺伝子治療があげられる。遺伝子治療を用いた戦略はたんぱく質治療の場合と基本的に同じである。遺伝子治療ではプラスミドあるいはウイルスを用いた遺伝子導入が主に用いられている。遺伝子治療は最適な条件において、標的とする組織においてたん白質を長期間高濃度で発現することが理論的には可能である。この点、たん白質を連日投与する場合に比べ、安価で実際的である。例えばVEGFの場合、分泌たん白質であるので、全ての細胞に導入する必要がない。したがって、その遺伝子を筋注によりデリバリーした場合、筋肉で得られる効率で局所のたん白質濃度を上げることが可能かもしれない。しかしながら、現在のプラスミドあるいはアデノウイルスを用いた遺伝子治療ではたん白質の発現の持続時間は1-2週間と短く、予想した程にはうまくいっていない。遺伝子治療技術の欠点としてはアデノウイルスたん白質に対して炎症反応が生じること、ベクターの投与量が同じでも患者が異なれば遺伝子発現レベルも異なるという点もある。遺伝子およびたん白質のデリバリーで共通の問題は、最適の投与ルートとは何かということである。遺伝子導入のアプローチの場合、効果的な局所濃度を得るためには、局所的にデリバリーできる技術が必要となる。これに関連し、アデノウイルスは内皮の障壁に対して不透過であること、血液循環において裸のDNAは速やかに分解されるだけでなく、血管内にプラスミド投与した場合その導入レベルは非常に低いことも知られている。

10. 遺伝子治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究とし

て遺伝子治療が用いられている（Table 3）。

フェーズ I の試験では、CMV プロモーター/エンハンサーにより VEGF₁₆₅ 遺伝子発現を促進し、小規模な左前開胸術を介して直接心筋に 125 μ g あるいは 250 μ g の量が投与され、プラスミドによりコードされる VEGF₁₆₅ の安全性および有効性が評価された。その結果、このようなアプローチは一般的に安全であり、手術できない冠動脈疾患の患者において、側副陰影の増加を示す所見が血管造影法により得られ、症状も有意に改善された。慢性心虚血の患者で、VEGF₁₆₅ をコードする naked プラスミドの投与前後における、梗塞、虚血および正常心筋が NOGA 左心室エレクトロメカニカルマッピングにより観察され、さらに好ましい結果が得られた。同様な結果がカテーテルを用いた心筋内投与でみられた。しかしながら、このような有効性は二重盲検無作為試験ではまだ試験されていない。

アデノウイルスの VEGF₁₂₁ 遺伝子治療の有用性について、侵襲的冠動脈バイパスの補助としてあるいは低侵襲開胸術を介した単独療法として試験された。その際、直接心筋へ注射することにより、可逆的な虚血領域に投与された Ad_{cv}VEGF₁₂₁ のフェーズ I 臨床試験が行なわれた。患者は 100 μ l/投与、10 箇所/患者および 5 つの投与グループ（4 \times 10⁸, 4 \times 10^{8.5}, 4 \times 10⁹, 4 \times 10^{9.5}, 4 \times 10¹⁰ pfu）のいずれかで処置された。この試験ではアデノウイルス投与に関連した副作用は示されず、かん流、狭心症の程度、ETT 評価において改善を示唆する結果が得られた。Ad-VEGF₁₆₅ および p1VEGF₁₆₅ リポソームの、血管形成術後の再狭窄の予防および心筋虚血の処理における安全性および有効性が KAT（Kuppia Angiogenesis Trial）で評価された。患者にはかん流により Ad-VEGF₁₆₅（2 \times 10¹⁰ pfu）あるいは VEGF₁₆₅ プラスミド（2000 μ g DNA）が投与された。このフェーズ II 試験では遺伝子導入に関連する副作用、臨床的な再狭窄の割合にコントロールとの違いはなく Ad-VEGF₁₆₅ を処置した患者において良好な

心筋のかん流が示された。以上に述べた試験の中には VEGF₁₆₅ が治療上有益な効果もたらす可能性を示唆するものもあるが、いずれも二重盲検では示されていない。以下の FGF 治療での経験が示すように、非盲検フェーズ I における有効性に関して肯定的な結果を、二重盲検フェーズ II/III 試験の成績で示すのは容易ではない。たん白質あるいはプラスミド投与後、そのデリバリーの有効性が薬物動態学解析により詳細に解析されない限り、血管新生が効率よくおきるとは判定できない。しかしながら、VEGF₁₆₅ により血漿レベルにおける循環 EPC が増加するという知見は興味深い。

同様な状況が冠動脈内投与による Ad-FGF-4 遺伝子治療試験でも起きた。二つのフェーズ I AGENT (Angiogenic Gene therapy) (血管新生遺伝子治療) で FGF-4 をコードするアデノウイルスをウイルス粒子として 3.3×10^8 から 10^{11} 個まで投与し、安全性および有効性が評価された。Ad-FGF-4 処置患者において機能的な改善 (ETT 評価、心筋かん流) の傾向が示された。しかし、大規模二重盲検フェーズ III 試験を行った時、治療効果は全く無かった。

なお、現在、末梢動脈障害の患者において、HGF/SF 遺伝子治療のフェーズ I 試験も行なわれている。

11. 細胞治療を用いた血管新生療法の概要

1. 血管新生 (neovascularization) の生理的な概念の項で述べたように、EPC が血管新生に関与する可能性が示されたことから、細胞治療を用いた血管新生療法の可能性についても検討が行われている。以下のようにその可能性を支持する動物実験の結果を示す。EPC を生体外で増殖させ、虚血後肢の無胸腺ヌードマウスあるいは梗塞ヌードマウスに投与すると、新生血管に取り込まれ、血流と心筋の機能が回復する。骨髄由来の単核球細胞あるいは Lin⁻, c-kit⁺ の細胞画分を虚血心筋に投与すると病態が改善する。濃縮したサイドポピュレーションの細胞を骨髄に移植する

と、梗塞心筋に取り込まれ、内皮細胞および心筋細胞に分化する。採取したばかりの骨髄穿刺液を豚アメロイドモデルおよび梗塞ラットモデルにデリバリーすると、血管およびかん流が増加する。虚血後肢モデルマウスに骨髄細胞を移植すると、血管壁には取り込まれないが、支持細胞として機能する。前駆細胞はパラクラインの機構によっても血管形成および組織再生を促進する可能性がある。血液を循環している細胞が心筋に強制動員されると、VEGF、MCP-1、FGF、Ang、IL-1 β 、TNF- α 、HGF、IGF-1、SDF-1 のような血管新生促進因子がすぐに放出され、その結果血管新生の促進およびアポトーシスの阻害が起きる。

骨髄由来細胞が虚血組織へ取り込まれる割合について検討が行われているが、その推定値は、内皮細胞の 3% および心筋細胞の 0.02% が骨髄由来であるというものから、内皮細胞および心筋細胞の最大 40% までが骨髄由来であるというものまで様々である。

12. 細胞治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究として細胞治療が用いられている (Table 4)。

最初の試験で重度の虚血心臓疾患の患者が冠動脈バイパス時に自家骨髄細胞の投与を受け、その後少なくとも 1 年追跡調査が行なわれた。骨髄細胞を腸骨から採取し、バイパスされない虚血心筋に 5×10^7 から 1×10^8 個/部位 (平均 10 部位) の細胞が投与された。術後の試験では患者 5 人のうち 3 人で冠動脈かん流の改善が示された。別の研究では、バイパス手術時に、6 人の患者に対して梗塞境界領域に沿って自家 AC133⁺ 骨髄細胞が 1.5×10^6 個投与された。この手法は安全であり、追跡調査では左心室の機能は 4 人の患者において、かん流は 5 人の患者においていずれも改善した。しかしながら、細胞治療は単独ではなく冠動脈バイパス移植に対する補助としてデリバリーされていることから、このようにコントロールグループがない条件では有効であると結論することは困難である。BM-MNC

(bone marrow-derived mononuclear cell) (自己骨髄由来単核球細胞)を用いた治療が十人の心筋梗塞の患者で試験された。フィコール濃度勾配により分離した BM-MNC (0.65% AC133⁺細胞と 2.1% CD34⁺細胞) が急性心筋梗塞発症後 5-9 日後の患者に、冠動脈血管造影の際に置いたバルーンカテーテルを介して投与された。標準治療のみ行なった患者に比べ細胞治療のグループでは 3 ヶ月後梗塞部位は有意に減少し、1 回拍出係数および駆出分画率が向上した。さらに安定狭心症の患者の虚血心筋内に、自家 BM-MNC を、NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に投与する試験が行なわれた。投与を行なった 8 症例で BM-MN を構成するそれぞれ細胞の割合は異なり、CD34⁺ 細胞 (0.9%-8.9%)、CD3⁺ T 細胞 (2.3%-12%)、CD11b⁺D15⁺ 顆粒球前駆細胞 (26.3%-70.6%) であった。細胞は NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に心筋内に投与された。3 ヶ月の追跡調査で症状と心筋かん流の改善が示された。

他の二つの試験でも、慢性虚血心臓疾患の患者に対する骨髄由来細胞の心内膜 (心臓) への移植が NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に行なわれた。吸引ろ過したばかりの未分画自家骨髄由来細胞、2.4ml (32.6 ± 27.5 × 10⁶ 個 /ml) が 10 人の患者に対し、12 箇所部位に投与された。投与した細胞は平均して以下のような構成を示した。多核白血球 74.6%、リンパ球 19.3%、単球 3.5%、巨核球 2.6% であった。CD34⁺細胞は 2.6% で、そのうち 47.9% が CD45 を共発現した。10 人の患者全てにおいて不整脈あるいは副作用はなく投与は成功であった。その内 8 人の患者は三ヶ月後狭心症スコアが改善された。20 人の患者 (処置 11 人、コントロール 9 人) による盲検非無作為試験において、メカニカルな機能が低下した心筋領域に対する、フィコール濃度勾配により分離した BM-NPC (25.5 ± 6.3 × 10⁶ 細胞 /患者) の投与が NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に行なわれた。移植された細胞集団は、コロニー形成アッセイ (顆粒球・マクロファージコ

ロニー形成単位) で評価したコロニー形成能で平均 2.4% ± 1.33% であり、CD45 低発現の CD34⁺造血前駆細胞から構成されていた。6 ヶ月および 12 ヶ月の追跡調査後、BM-NPC の心内膜への投与により持続的な治療効果が示され、心筋かん流と運動能が改善された。その効果は単核球、B 細胞および造血前駆細胞のサブポピュレーションの割合と一致した。

他の研究において、急性心筋梗塞 5-29 日後、BM-MNC (78 ± 41 × 10⁶ 個/患者) が、冠動脈ステントの留置部位に冠動脈内投与された。BM-NPC は平均して CD34⁺ ~0.6%, CD117⁺ ~1.7%, CD133⁺ ~0.6% の細胞から構成されていた。6 ヶ月後、処置を受けた 20 人の患者を磁気共鳴により評価すると、非無作為コントロールグループと比較して、局所および広範囲において左心室機能の有意な改善がみられた。

以上述べた全て試験において、ある程度機能の改善がみられたが、サンプルサイズが非常に小さいことに加えて、盲検および無作為の同時コントロールグループが無いことためその評価は困難であった。このように、これらの研究から結論できることは冠動脈内あるいは心筋内経路による細胞の投与は安全と思われるということである。

TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement) (急性心筋梗塞における前駆細胞の移植と再生の促進) 試験では、再かん流急性心筋梗塞の 59 人の患者に BM-MNC あるいは CPC (circulating blood-derived progenitor cells) (循環血液由来前駆細胞) が無作為に投与された。CPC はヘテロな前駆細胞の集団であり、3 日間の ex vivo 培養後フェノタイプを調べたところ、Dil アセチル化 LDL を取り込み、VEGFR2、endoglin、von Willebrand factor、PECAM、VE-cadherin あるいは CD146 といった典型的な内皮マーカーたん白質を発現することから、内皮のフェノタイプであることが示された。標準的な手法により分離された BM-NPC は CD34 および CD45 陽性であった。急性心

筋梗塞4日後、患者は前駆細胞(10ml 懸濁液)が投与された。左心室血管造影法により、BM-NPCおよびCPCをかん流したグループと非無作為対照コントロールグループを比較して評価すると、広範囲において駆出分画率が有意に改善された。機能的な改善と収縮末期容量の低下が磁気共鳴映像法により確認された。1年の追跡調査後、BM-NPCあるいはCPCのかん流は安全であり、BM-NPCグループあるいはCPCグループで心筋の機能が改善され、両グループで差はなかった。この研究は前に進むための大きなステップではあるが、盲検および同時コントロールが無いため機能的に評価するのは依然として非常に困難であった。フェーズI臨床試験 BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) (ST上昇型の梗塞の再生を促進するための骨髄移植)では、頸皮動脈インターベンション後、それぞれ30人の患者が冠動脈内自家骨髄細胞投与あるいは標準的な医療処置を受けた。骨髄細胞は採取後ゲラチン-ポリコハク酸塩濃度勾配沈降により128mlから26mlに濃縮した。総量として 24.6×10^8 個の細胞が得られ、その中には平均 9.5×10^6 個のCD34⁺細胞 3.6×10^6 個の造血コロニー形成細胞が含まれていた。6ヵ月後、骨髄細胞の投与により左心室の心臓収縮機能が促進され、ステント再狭窄や向不整脈作用のような副作用は起きなかった。しかしながら、18ヶ月の追跡調査後、コントロールにおいても持続的な改善が起こったため、骨髄細胞処置とコントロールグループの差は消失した。細胞を用いた治療は有望ではあるが、その臨床試験の結果の解釈は注意を要する。公正な評価を行なうには、適切な大規模の無作為、二重盲検試験が必要である。

慢性虚血心臓疾患の患者の細胞治療の欠点は、患者自身の骨髄単核球細胞において血管形成能が低下することである。患者(n=8)と健常人(n=8)から分離されたBM-NPCは同じ前駆細胞:CD34⁺/CD133⁺、CD49d⁺、CXCR4⁺から構成されるが、患者の細胞にお

けるコロニー形成能、SDF-1あるいはVEGFに対する遊走反応は健常人の細胞と比較すると有意に低い。患者からのBM-MNCを虚血後肢に投与した場合、健常人のコントロールからのBM-MNCと比較すると、血流の回復効果が低いことが示された。

13 血管新生療法の問題点と今後の展望

血管新生増殖因子のたん白質、および遺伝子治療、細胞治療による血管新生療法の臨床試験の結果は示したように全体として期待を裏切るものであり、処置した患者においてプラセボを超える改善を、無作為二重盲検試験において、コンスタントに示すことができなかった。以下にその問題点と今後の展望について示す。

13.1 現在の評価項目を再検討する必要がある

このようにうまくいかなかった原因として評価項目が間違っているあるいは評価項目を査定する方法が不適切あるいは妥当ではない可能性が考えられる。これら臨床試験で用いられる放射線映像技術(例えば、タリウム、sestamibi)は空間分解能が低く、末期のCAD患者における心筋かん流における小さな変化を検出する能力には限界がある。さらに、長期にわたり測定する心筋虚血の割合に大きなばらつき(50%までの変動)があるように思われる。そのため治療により向上する心筋のかん流を検出するうえにおいて、シンチグラフ技術の有用性については限界があるかもしれない。血管新生療法で処置した心臓領域内のかん流変化を検出する場合、心筋かん流を定量化できる可能性のある、高空間分解能を有した核磁気共鳴映像法は、より適しているかもしれない。将来の研究において、概説した様々な新規の治療の有用性を評価する場合、処置前後における心筋かん流の評価には、MRIのようなより高感度の技術を用いることを考える必要がある。

13.2 従来検討されていなかった血管新生促

進因子を用いる

現在臨床研究で検討されているたん白質、あるいは遺伝子は FGF、VEGF、GM-CSF、HGF と限られている。5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項で述べたように、PDGF、MCP-1、G-CSF、Ang-1、Ang-2、NGF、NPY など様々な因子が血管新生促進作用を示し、その作用機構は必ずしも同じでないことから、このような因子を用いることも検討する必要がある。これはたん白質および遺伝子治療において同様である。

13.3 複数の血管新生促進因子を用いる

血管新生のプロセスは複雑で高度に秩序だった調節を受けていることから、一種類の増殖因子では、末期の冠状動脈性心臓病を治療する際、特効薬とはならない可能性がある。むしろ、CAD の患者の治療を進展させるには複数の増殖因子を組み合わせた治療法が臨床上の有用性をコンスタントに得るために必要かもしれない。

増殖因子を組み合わせて用いる戦略は、増殖因子の治療効果が相乗的であること、ある因子が血管形成の開始を促進するのに対し他の因子は血管の成熟を促進するといったように、それぞれの因子がお互いに機能を補えることから合理的といえる。インビトロにおいて、増殖因子の相乗性が、例えば FGF-2、VEGF-A、VEGF-C で示されている。種々の動物モデルで、FGF-2 は PDGF 受容体をアップレギュレーションすることから、PDGF-BB と FGF-2 は相乗的であった。相乗性が治療効果を発揮する場合は、相乗性が治療効果に限定されている時、およびどちらかの投与量を低下させることにより、FGF の形質転換作用あるいは VEGF-A の過透過性のような副作用が抑制され、かつ治療効果が低下しない場合である。このような増殖因子を組み合わせた臨床試験はまだ実施されていない。

その他の合理的なアプローチは、5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項で述べたように、VEGF あるいは FGF-2 のような

血管新生促進因子と周皮細胞の強制動員を促進する Ang-1、PDGF-BB のような成熟促進因子を組み合わせて用いることである。壁細胞（周皮細胞）は過透過性を抑制するだけでなく、未成熟な血管を安定化させる。機能がお互いに効率よく補える増殖因子の組み合わせとして、Ang-1 と VEGF-A そして PDGF-BB と FGF-2 が考えられる。

一方、増殖因子の組み合わせで用いると、治療戦略がより複雑になる。例えば、各因子の相対的な投与量、各因子の投与スケジュール、各因子のデリバリー方法などが問題点となり、これらを全て満たす治療戦略を設定することは必ずしも容易ではない。

13.4 他の増殖因子をアップレギュレートする因子を用いる

最近、インビボにおいてアデノウイルスベクターを用いて Hif1- α を過剰発現すると、血管新生増殖因子が多数アップレギュレートされることが示されている。増殖因子の作用は動物の種類により異なる場合があるので、ヒトへ適用する前に複数の動物種で試験する必要がある。これに関連し、内在性 Hif1- α の不活性化を阻害すると、虚血四肢における血管新生が促進される。このように、他の増殖因子をアップレギュレートできる因子を用いた戦略も有効かもしれない。

13.5 共通の経路を標的とする

増殖因子のシグナル伝達における共通の経路のなかで、NO の産生は治療の非常に有力な標的である。主に *in vitro* の知見から、VEGF、FGF、TGF- β による血管新生促進効果において NO の関与が示唆されている。しかしながら、NOS 阻害剤、あるいは eNOS および iNOS ノックアウトマウスにおけるインビボの知見では、NO の関与について以下のように統一した結論が出ていない。最も説得力のある *in vivo* の知見は以下の Murohara らによる研究である。ウサギ虚血後肢モデルにおいて NO 産生促進因子である L-arginine を食事に加えて与えると、血管新

生が促進された。また、マウスの虚血後肢モデルにおいてeNOS欠損マウスでは野生型のマウスに比べ、血管新生は阻害された。対照的に血管新生の非外科的腸間膜ウインドーモデルで、NO合成の阻害剤であるL-NAMEを与えるとbFGFによる血管新生が促進された。L-NAMEを与えた野生型のマウスおよびeNOSおよびiNOS欠損マウスを用いた、*in vivo*マトリゲルペレットモデルの結果では、NOはFGF-2およびVEGF-Aによる血管新生誘導に関与していないことが示されている。同様に、血管新生の腫瘍モデル、*in vivo*のマトリゲルモデルにおいて、NOを放出するNOドナーであるSNAPおよびSNAGを投与すると、FGF2による血管新生の誘導が阻害された。これらの知見は、VEGF、FGF、Ang-1を含む様々な増殖因子により誘導される血管新生において、NOがメディエーターとして作用することを示す数々の報告と対照的である。従って、血管新生および動脈新生におけるNOの役割について、統一的な見解は得られておらず、NOドナーあるいはNO合成酵素阻害剤がそれぞれ血管新生を促進あるいは抑制するかどうかについては、臨床的に試験されていないというのが現状である。

13.6 持続的なデリバリーが可能な方法を用いてたん白質を投与する

血管新生療法を効果的に行なううえにおいて、デリバリーの持続時間が重要な点である。血管新生促進因子のほとんどは内皮細胞の生存因子としても作用する。したがって、標的細胞における初期のアポトーシスを抑制するためには、単一増殖因子のデリバリーでは持続する必要があると考えられる。増殖因子を組み合わせた最近の研究では、血管新生の初期に血管の安定性が決定されることから、このような治療ではデリバリーは短期間のほうがよいことが示唆された。

一方、増殖因子を長時間デリバリーするために、各種のマトリックスが設計されている。PDGF-BBのデリバリーにセファロースヘパリンビーズを用いた場合、10日間にわたり

一次速度式に基づいた良好な放出が起こり、その結果、虚血心筋の流量および機能が改善した。さらに scaffold として poly(lactide-co-glycolide) を用いると、VEGF₁₆₅とPDGF-BBが異なったキネティクスで効率よく同時にデリバリーされる。生体適合性があり放出が緩やかなポリマーをうまくステントの上にコートできれば、この領域は急速に進歩する可能性が高い。たん白質のデリバリーを持続させる他の手段は、プラスミド、複製欠損アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスを用いた遺伝子治療である。持続的にデリバリーするため、たん白質あるいは遺伝子治療のどちらを用いるかは、薬物動態、安全性、コストに基づいて最終的に決定することになる。

13.7 たん白質を標的部位に対して効率よくデリバリーする

これに関しては、主としてFGF-2の生体における分布について、多くの研究が行なわれた。その結果、FGF-2を静脈内あるいは冠動脈内に投与すると、心筋内、末梢動脈障害の場合は筋肉そして心膜内へ選択的にデリバリーされた。虚血領域に対してFGF-2を心筋内投与した場合、局所における濃度は特に高かった。デリバリーは虚血ゾーン、境界ゾーン、流域に対して行なう必要があると考えられるが、効力を比較した研究はほとんどない。多くの虚血後肢の研究から示されているように、理想的なデリバリーとしては、持続的な動脈内デリバリーが優れているように思われる。しかし、このデリバリーは冠動脈系では技術的に困難である。他のデリバリー法として、冠状静脈内への逆投与がある。この技術は、FGF-2の単回投与では成功しているが、最終的な実現可能性および効果は、臨床試験の結果を待たなければ判断できない。

13.8 増殖因子を遺伝子導入した細胞および増殖因子によりプライミングを行なった細胞を用いる

骨髄由来幹細胞は虚血組織における血管新

生へ寄与する。多能性造血幹細胞は、血管新生のプロセスに関与する内皮細胞に分化できる。5. 血管新生療法において有望な増殖因子の項に述べたように、幹細胞から内皮細胞への分化は、様々な増殖因子により調節される。したがって、骨髄由来幹細胞を移植前にこれら増殖因子でプライミングを行なうことにより内皮細胞への分化がより促進される可能性がある。これに関連し、移植された筋細胞の心筋梗塞組織への生着を、HGF が促進することを示唆する知見もある。このように、細胞と血管新生促進因子を組み合わせた治療法は有効な治療法として将来用いられる可能性を秘めている。また、移植する細胞は、デリバリーが必要な標的遺伝子のキャリアーとしても用いることができる。

13.9 内在性前駆細胞を強制動員する

分離した幹細胞を投与する代わりに、血管新生を促進する、骨髄および他の組織からの内在性前駆細胞を強制動員することは非常に魅力的な治療アプローチと思われる。5. 血管新生療法においても若干ふれたが、以下にその可能性を支持する実験結果の詳細について述べる。サイトカイン (G-CSF、Ang-1、PIGF) およびケモカイン (SDF-1) は骨髄から EPC の動員およびその後の末梢循環における増加を促進する。なお、EPC、SDF-1 そして VEGF₁₆₅ のレベルの上昇において、どの動員因子が最も強い作用を示すかについては明らかではない。動物モデルでアデノウイルスベクターを用いて SDF-1 および VEGF の遺伝子を静脈内に投与すると、造血前駆細胞および循環 EPC の強制動員が速やかに誘導された。一方、Ang-1 による前駆細胞の強制動員の誘導は、遅延性であり顕著でない。しかしながら、VEGF と Ang を組み合わせるとその効果は相乗的であり、循環中に前駆細胞がより長期にわたる上昇した。さらに、それに関連し骨髄における毛細血管の増殖の増大、結果的に脾臓の巨大化の原因となる脾臓への前駆細胞のホーミングがおきた。患者における VEGF 遺伝子導入により安全な条件にお

いて循環 EPC が増加した。

他の候補としては G-CSF と GM-CSF があげられる。げっ歯類および人間以外の霊長類における急性心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞後、G-CSF を投与すると、心臓の機能の改善、毛細血管密度の増加、心筋細胞死の低下が起きたしかしながら、心筋梗塞の患者において冠動脈ステントの存在で G-CSF を投与すると、ステント再狭窄が顕著に増加したため、処置は中止された。GM-CSF を組換え体として毎日投与すると、ウサギおよびマウス角膜モデルにおいて EPC が動員され、虚血後肢の新血管形成が促進された。ロムルチド (200 μ g/kg/日) により GM-CSF を誘導すると、梗塞ラットにおいて梗塞からの回復が遅延し、梗塞が拡大した。心筋梗塞の初期段階に GM-CSF を誘導すると、単核球の動員が促進され、梗塞部位における不適切なコラーゲン生成がおきた。したがって、GM-CSF 投与の場合、悪い時期に悪い細胞が誘導されるという事態を避ける必要がある。GM-CSF 治療の安全性についてはいくつかの研究で評価されている。冠動脈疾患の患者における小規模無作為、二重盲検、プラセボコントロールの冠動脈内 GM-CSF 投与の研究では安全性および冠動脈側副血流の改善が示された。

赤血球分化因子として知られる Epo (Erythropoietin) は EPC の動員を促進する。Epo で処置したマウスでは骨髄および末梢血液における EPC の数、側副の拡大が促進され、後肢虚血の場合には血流が改善された。冠動脈心臓病の患者において、Epo の血清レベルは循環 EPC あるいは骨髄前駆細胞の数と相関した。

HMG-CoA 還元酵素の阻害剤であるスタチンはマウスおよび安定冠動脈疾患の患者において EPC の動員およびその機能的を促進する。スタチンによる EPC の分化の誘導は PI3-kinase/Akt を介している。その他の可能性として、EPC の増殖促進および老化を低下させるサイクリンのアップレギュレーション等、細胞周期に関わる遺伝子発現の調節が考えられる。同様にエストロジェンは EPC の

アポトーシスを抑制し、骨髄由来 EPC の強制動員および増殖を促進した。エストロジェンの効果は eNOS^{-/-}マウスにおいて完全に消失したことから、eNOS 依存性の機構が考えられる。VEGF による EPC の強制動員の誘導も eNOS 欠損マウスでは低下することから、eNOS は骨髄由来 EPC の強制動員において必須の役割を果たしていると考えられる。

13.10 本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害する

血管新生のリスクファクターが有無の虚血動物モデルあるいはヒト疾患組織において、増殖因子および増殖因子受容体の発現に関するデータが少ないことを考えると、欠乏していると推測される因子を補充する治療戦略は必ずしも合理的ではないようにも考えられる。また、生体において増殖因子の発現が増加している状態で、それ以上あるいはそれよりもはるかに多い量の増殖因子を外から投与した場合、血管新生は促進されるのかという疑問も残る。多くの前臨床試験では、実際 VEGF および FGF を適切に投与すれば、血管新生が促進されることが示されている。しかし、正常をはるかに超えるレベルで増殖因子を投与すると、例えば、VEGF および FGF の場合、病的な血管形成が起きる可能性があり、治療濃度域は狭いと考えられる。

したがって、本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害することに焦点をおいた治療も考える必要がある。例えば、睡眠により誘導される角膜の低酸素刺激では、血管新生が起きない。これは角膜組織のいたる所に発現している HIF-1 α のドミナントネガティブミュータントによると考えられる。興味深いことに、このミュータントは低酸素症によっても調節される。HIF-1 α ミュータントのアンタゴニストにより、角膜の低酸素刺激による血管新生反応の誘導が回復する。他の生体由来の血管新生の阻害剤、例えばエンドスタチン、トロンボスポンジンは組織虚血の間アップレギュレートされる。興味深いことに、最近の知見によると、ヒト平滑筋肉腫セルラ

イン、SK-LMS-1 細胞の担ガンモデルにおいて、HGF は部分的ではあるがトロンボスポンジン-1 のダウンレギュレーションを介して腫瘍における血管新生を誘導する。このように、抗血管新生因子の作用を弱めることにより治療効果が改善する可能性がある。

13.11 遺伝子治療において、遺伝子をどこにデリバリーするか

遺伝子治療における望ましい遺伝子のデリバリー部位は治療の最終目標および増殖因子の性質により変わりうる。毛細血管の成長を意図する場合は梗塞先端部位が望ましい。健康な組織において側副は、開在冠動脈血管から冬眠心筋へと成長する。導入する部位の微小環境および産生される増殖因子の標的細胞も考慮に入れる必要がある。増殖因子は標的細胞において発現する受容体を介して機能を発揮する。治療効果を得るにはリガンドと受容体の相互作用が必須である。ベクターあるいは産生されたたん白質は正常な基底膜をうまく貫通できない。多数の平滑筋層で覆われた大きな内径の血管の場合はなおさらである。従って、動脈内皮に作用することを意図して増殖因子を用いる場合は、血管の管腔で作用できるようにする必要がある。血管系を囲む組織の構成細胞である壁細胞に増殖因子を作用させる場合も同様である。増殖因子の可溶性によっても、リガンドのバイオアベイラビリティが調節される。細胞表面のヘパリンプロテオグリカンに結合しやすい増殖因子は、産生細胞の周辺にとどまる。一方、可溶性増殖因子は拡散し、広範囲の組織をカバーする。病的状態の微小環境では、増殖因子のデリバリーの効率が悪い。一方、増殖因子をあまりにも広範囲に過剰発現した場合は重大な副作用がおきる。発現は適切なデリバリー方法を用いて的確な組織のコンパートメントに対し行なう必要がある。しかしながら、局所的に遺伝子導入する場合、導入されたコンパートメントの位置について詳細に調べることは事実上困難である。また、特定の細胞のみに発現させることも困難である。最近、遺伝子デ

リバリーベクターを組織あるいは細胞に対して特異的にターゲティングする技術が発達しており、遺伝子導入の心筋特異性が改善している。

13.12 遺伝子治療において、遺伝子をどのようにデリバリーするか

心筋における治療的血管新生において多種多様なデリバリーの方法が導入されている。例えば、増殖因子をマウスの尾静脈を介してデリバリーする方法、大動物モデルにおいて最先端の高度な技術を用いて局所にデリバリーする方法などがある。多くのモデルでは開胸術のような侵襲的な手法が必要とされるが、それ自体で若く健康な動物において損傷を与えることになり、その結果、修復過程が始まり内在性の増殖因子が誘導される。さらに重要な点は、別の治療を最も緊急に必要とする重病の患者には、非常に侵襲的でストレスの多い遺伝子導入方法は適していないということである。遺伝子導入ベクターは標準サイズの血管造影用カテーテルを用いて冠動脈に導入できる。冠動脈内投与のアプローチは比較的単純で、特別な器具や医師に特別な訓練は必要なく、血管造影術と組み合わせると侵襲的な手法は必要ではない。通常、冠動脈内投与は内皮細胞へ遺伝子を導入する目的で用いられる。動物モデルで良好な治療効果が報告されているが、これまでの報告によるとヒトでは臨床効果は低い。静脈内および動脈内のアプローチでは特別な器具は必要としない。組換え FGF-2 を用いた検討では静脈内投与は有効ではないが、冠動脈投与は有効であることが示されている。内皮はたん白質およびウイルス粒子の障壁である。bFGF の組織分布を動脈内あるいは静脈内投与で調べると、¹²⁵I 標識した bFGF のそれぞれ 0.88% および 0.26% が心筋に見つかっている。

治療薬は血管周囲の組織にもデリバリーできる。心膜内のアプローチではベクターは心臓周囲の心膜内にデリバリーされる。心内膜および心外膜に対する導入効率は良好であるが、側副へのかん流では治療効果はみられていな

い。高濃度の治療用たん白質が心嚢液で産生されるが、心筋を貫通することができず、成長している側副血管に到達できない。注射針付きのカテーテルを用いることにより効率よく局所にデリバリーできる。血管周囲で局所的にたん白質濃度が高くなっても血管新生反応が起こるのは主として血管の外膜であり、血管壁を貫通できない。

心筋内遺伝子導入では標的部位にベクターを直接デリバリーできる。心筋内への直接投与は従来の外科的処置と組み合わせて行なえる。侵襲的な外科的処置および増殖因子の局所的なデリバリーができないような障害の程度が高い患者には、NOGA およびスチレットの注入カテーテルのような経皮的な技法を用いた心筋内への直接投与が適している。さらに、臨床試験において不可欠である治療効果および副作用の可能性は、大動物モデルで容易に評価できる。ヒトの治療用に開発された技術は大動物モデルにおいても適用でき、その結果に基づき臨床試験に使用される段階に移行する。

13.13 遺伝子治療においてどのような遺伝子導入ベクターを選択するか

遺伝子治療において遺伝子導入に用いるベクターの選択も重要なポイントである。急性心筋梗塞後の治療と慢性心筋虚血とでは遺伝子発現のタイムコースを変える必要がある。同様に、慢性虚血において閉塞性動脈疾患の進行が緩やかで、その際酸素圧の低下がみられるような比較的健康な心筋と梗塞後に障害を受けた心筋とでは形成される微小環境は異なる。増殖因子をコードする遺伝子は非ウイルスプラスミド構成体あるいはウイルスベクターを用いてデリバリーできる。プラスミドは安全であり作成も容易ではあるが、心筋における導入効率は非常に低いのが欠点である。なお、リポソームを用いることによりその導入効率が顕著に改善できるという報告もある。

遺伝子治療を目的とした新しいウイルスが開発され、既存のベクターも改変により改善されていることから、ウイルスベクターが多

く用いられるようになってきている。遺伝子治療における理想的なウイルスベクターとは導入効率が高い、毒性が低い、免疫原性が無い、長い遺伝子が挿入できる、標的とする細胞だけに遺伝子が発現できる、遺伝子発現が調節できるといった特徴を有している必要があるが、このような特徴の全てを有するベクターはまだ開発されていない。遺伝子導入のベクターを臨床適用する場合、品質が最も重要な選択基準となる。心筋梗塞後において局所組織かん流のサルベージが起きるには、短時間高い効率で導入する必要がある。アデノウイルスは利用頻度が最も多く研究も進んでいる遺伝子導入ベクターの一つである。アデノウイルスの長所は導入効率が高い、導入遺伝子の発現能が比較的高い、高いタイターで産生できるという点である。正常の免疫系を有する大動物における導入遺伝子の発現は一過性で2-3週間続き、その期間内で毛細血管ネットワークの形成、組織かん流の増加は十分起きる。

側副血管の成長および新生血管の動脈形成には数週間から数ヶ月までとより長い発現が必要である。このような長期間の発現にはエピゾームベクターあるいは宿主細胞染色体に組み込む可能なベクターを用いる。AAV (Adeno-associated vector) アデノ随伴ウイルスはアデノウイルスより導入効率は低い、筋肉組織に対して指向性を有し、遺伝子発現は導入後1年間持続する。AAVに導入できるDNAの長さは最大5 kbであり、ほとんどの増殖因子の遺伝子は導入可能である。しかしながら、場合によってはそれ以上の長さの遺伝子を導入する必要があることから、この導入能力の低さが開発の妨げとなっている。レンチウイルスはもっと長い遺伝子が導入可能であり、静止期および増殖期の細胞に導入できる。宿主染色体へ組み込まれるため安全性が懸念されるが、その解決法として数々の発現調節系が開発されている。また、心臓血管へのアプローチにおける欠点は導入効率の低さとウイルス標品のタイターの低さである。

13.14 遺伝子治療において治療薬をどれだけデリバリーするか

遺伝子治療のアプローチに限った話ではないが、この場合も治療濃度域がある。治療濃度域とは、最大限の治療効果と最小限の副作用の両方が得られる濃度域を指す。増殖因子を同じ量投与しても患者により作用発現の強さは変動するが、遺伝子治療の場合はそれに加えて導入効率およびたん白質産生レベルも患者によりかなり変動する。したがって、ウイルスデリバリーのアプローチでは最適量の増殖因子が産生されるウイルスの濃度および投与した組織環境下において増殖因子が標的とする組織にうまく分布できるかどうかのポイントとなる。

従来の薬理学的アプローチでは、薬は通常様々な組織に分布される。遺伝子治療は治療たん白質を局所にデリバリーできるという利点があるが、それは逆に正確な投与量の算定、さらにデリバリー自体も難しくなるという欠点にもなる。血流における薬の濃度は決めるのは容易であるが、大動物において局所たん白質濃度が最適になるようなウイルス投与量を正確に決めるには、通常よりはるかに多くの前臨床試験が必要である。治療効果は標的組織におけるウイルス溶液の拡散、導入効率、導入細胞によるたん白質の発現レベルおよび増殖因子の溶解性など様々な因子により総合的に決定される。

大部分の前臨床遺伝子治療実験はマウスモデルで行われている。マウスモデルは遺伝子導入および遺伝子ノックアウト実験、増殖因子の作用の検討では非常に有用であるが、小動物で得られた実験結果を基にしてヒトの治療を行おうとする場合は十分注意する必要がある。マウスにおけるウイルスの投与量、たん白質濃度の実験結果はヒトへそのまま外挿できない場合がある。例えば、マウス尾静脈への投与においてウイルス粒子として 1.0×10^{11} 個および容量として 3ml 用いる場合、その値をそのままヒトに外挿すると、それぞれ 1.0×10^{14} 個および 7L になる。また、小さな組織では増殖因子の効力および正確な投与量